

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-26383

(P2000-26383A)

(43) 公開日 平成12年1月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 7 C 231/12		C 0 7 C 231/12	4 H 0 0 6
237/06		237/06	
// C 0 7 C 231/02		231/02	

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平10-194378

(22) 出願日 平成10年7月9日 (1998.7.9)

(71) 出願人 591014972

株式会社 伊藤園

東京都渋谷区本町 3-47-10

(72) 発明者 安東 勢津子

福岡市南区花畑 2丁目43-18

(72) 発明者 角田 隆巳

静岡県榛原郡相良町女神21 株式会社伊藤園 園内

(72) 発明者 杉本 明夫

静岡県榛原郡相良町女神21 株式会社伊藤園 園内

(74) 代理人 100072084

弁理士 竹内 三郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テアニンの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 L-グルタミン酸-γ-エチルアミド (L-テアニン) をペプチド合成によって、少ない工程で高純度、高収率で製造する。

【解決手段】 グルタミン酸誘導体 (Boc-Glu-OtBu) をペプチド合成の出発原料とし、これをエチルアルコールに溶解し、この溶液に縮合剤としての「DCC」と水溶性活性エステル試薬としての「4-ヒドロキシフェニルジメチルスルホニウムメチルサルフェイド」とを加えて尿素誘導体を析出させ、更にエチルアミン塩酸塩とpH調整剤としての「DMAP」との混液を加えてBoc-Glu(NHC₂H₅)-OtBuを得た。これを塩化水素ガスをギ酸中に吹き込んだ溶液で処理してα位のアミノ基及びカルボキシル基のOtBu基を脱離させてテアニンを得た。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタミン酸の α 位のアミノ基をターシャルブチルオキシカルボニル基(Boc基)で保護し、かつカルボキシル基をターシャルブチルエステル基(OtBu基)で保護してなるグルタミン酸誘導体(Boc-Glu-OtBu)を溶媒に溶解し、この溶液に縮合剤と水溶性活性エステル試薬とを加えて尿素誘導体を析出させ、更にエチルアミン塩酸塩とpH調整剤との混液を加えてターシャルブチルオキシカルボニル- γ -エチルアミドグルタミン酸ターシャルブチルエステル(Boc-Glu(NHC₂H₅)-OtBu)を得、これを酸処理して α 位のアミノ基及びカルボキシル基のOtBu基を脱離させることを特徴とするテアニンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ペプチド合成によりL-グルタミン酸- γ -エチルアミド(L-テアニン)を製造する方法であって、特に食品添加剤として安全に使用できるテアニンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】お茶のうま味成分として知られているテアニンは、カフェインによる興奮の抑制作用、血圧降下作用、リラックス作用、脳機能改善作用などの有用性が知られている。しかし、茶葉中に含まれるテアニン量はわずかに1~2重量%で、茶ポリフェノールが10~15重量%含まれているのに比べると非常に少ない。したがって、茶葉から抽出したテアニンを産業的に利用することは量的にもコスト的にも実用的でなく、従来から食品添加物や医薬品原料として安価で安全なテアニン製造方法が求められていた。

【0003】従来のテアニンの化学合成法としては、先ず、実験室的製法として、グルタミン酸を塩酸存在下で無水エタノールと振り混ぜた後、低温下で過剰の塩酸とエタノールとを除き、析出した塩酸塩をメタノールに溶かし、この溶液に計算量のアンモニアを加えて冷却してL-グルタミン酸- γ -エチルエステルを得、これをクロロカルボキシル酸ベンジルエステルと反応させてNカルボキシベンジル-L-グルタミン酸- γ -エチルエステルとし、次にこれをエチルアミンと反応させてN-カルボキシベンジル-L-グルタミン酸- γ -エチルアミドとし、次いで白金触媒下で水素添加してL-グルタミン酸- γ -エチルアミド(L-テアニン)を得る方法が開示された(酒戸弥二郎ら：日農化誌23,269(1950))。その後、工業的製法として、例えば特開平5-70419号公報等において、L-グルタミン酸の γ -カルボキシル基をベンジル化して保護すると共に、アミノ基をトリチル化して保護し、これをペプチド合成の出発原料とするテアニンの製造方法等が開示されている。

【0004】しかしながら、従来の製法の多くは、高純度のテアニンを得られたとしても工程数が多く煩雑でしかも収率が低く、得られるテアニンは高価なものとなってしまうのが現実であった。例えば、グルタミン酸をペプチド合成の出発原料に使用する場合、 γ -カルボキシル基をベンジルエステルで保護するのが一般的であったが、ベンジル基の脱離が困難であるため、工程数が多くなるか、工程時間が長くなるか、或いは反応の条件が過酷となるなどの問題があった。一方、得られたテアニンを食品添加物として使用することを考慮すると、純度を高くすることは勿論、人体に有害な有機溶媒や金属をできるだけ使用しない製法が望まれるところである。

【0005】そこで本発明は、より少ない工程で高純度のテアニンを高収率で得ることができ、しかも人体に有害な有機溶媒や金属をできるだけ使用しないテアニンの製造方法を開発することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】かかる目的のための本発明は、グルタミン酸の α 位のアミノ基をターシャルブチルオキシカルボニル基(Boc基)で保護し、かつカルボキシル基をターシャルブチルエステル基(OtBu基)で保護してなるグルタミン酸誘導体(Boc-Glu-OtBu)を溶媒に溶解し、この溶液に縮合剤と水溶性活性エステル試薬とを加えて尿素誘導体を析出させ、更にエチルアミン塩酸塩とpH調整剤との混液を加えてターシャルブチルオキシカルボニル- γ -エチルアミドグルタミン酸ターシャルブチルエステル(Boc-Glu(NHC₂H₅)-OtBu)を得、これを酸処理して α 位のアミノ基及びカルボキシル基のOtBu基を脱離させることを特徴とする。

【0007】すなわち、本発明の第一の特徴は、グルタミン酸の α 位のアミノ基をターシャルブチルオキシカルボニル基(Boc基)で保護し、かつカルボキシル基をターシャルブチルエステル基(OtBu基)で保護してなる「グルタミン酸誘導体(Boc-Glu-OtBu)」をペプチド合成の出発原料としたことにある。このようにアミノ基をBoc基で保護し、カルボキシル基をOtBu基で保護することにより、酸処理によって両保護基の脱離を一度に行うことができ、しかもかかる脱離を穏やかな条件下で行うことができる。更には、脱離反応に伴う生成物はイソブチレンガスと二酸化炭素であるから容易に系外に除去することができるほか、アミノ分解(アミノリシス)も受けないのでエチルアミンとの反応にも安定である。なお、アミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル(Z)基を用いてテアニンを得ることも可能ではあるが、本発明によればZ基で保護する場合に比べて保護基の脱離が一段階少なくなるためテアニンの収率をより高めることができる。

【0008】本発明の第二の特徴は、「Boc-Glu-OtBu」を「溶媒」に溶解し、この溶液に「縮合

剤」と「水溶性活性エステル試薬」とを加えて尿素誘導体を析出させ、更に「エチルアミン塩酸塩」と「pH調整試薬」との混液を加えて「ターシャルブチルオキシカルボニル- α -エチルアミドグルタミン酸ターシャルブチルエステル (Boc-Glu(NHC₂H₅)-OtBu)」を得た工程、すなわちエチルアミンとして「エチルアミン塩酸塩」を加えると共に、これと組み合わせ「pH調整試薬」を加えた点、更には「縮合剤」に「水溶性活性エステル試薬」を加えた点にある。

【0009】エチルアミンとして、無水エタノールアミンではなくエチルアミンの塩酸塩を加えることにより、取り扱いが簡便（無水エタノールアミンは反応が激しく危険を伴う。）になるばかりか、非常に穏和な条件下で合成することができる。ただし、本発明はエチルアミンの塩酸塩を中和する必要があることも見出し（後述の比較例2参酌）、このため「pH調整試薬」と組み合わせて加えるようにしている。また、「縮合剤」に「水溶性活性エステル試薬」を加えて組み合わせて使用することにより、テアニンの収率を顕著に高めることができ、しかも反応の進行を早めることができる。更に、「水溶性活性エステル試薬」を加えることにより、グルタミン酸誘導体を水溶性活性エステルとすることができ、含水溶媒中で縮合を進めることができる。

【0010】ここで、「溶媒」としては、ジクロロメタン、エチルアルコール、ジメチルホルムアミド (DMF)、クロロホルム、テトラヒドロフランなどのBoc-Glu-OtBuを溶解可能な溶媒であれば用いることができるが、反応促進と人体に対する安全性との観点からするとエチルアルコールが最も好ましい。「縮合剤」としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ベンゾトリアゾール-1-イルートリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩 (BOP) を好ましく使用することができる。そのほか、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC) やN-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (EDC=WSC I) など通常ペプチド合成で使用される縮合剤を使用することも可能であるが、テアニンの収率及び含水溶媒中での溶解性などの点から上記のDCC、BOPが好ましい。

【0011】「水溶性活性エステル試薬」としては、「4-ハイドロキシフェニルジメチルスルフォニウムメチルサルフェイド」を好ましく使用することができる。上記エチルアミン塩酸塩が溶けなければ反応はうまく進まないが、エチルアミン塩酸塩は水にとっても可溶であるため、含水溶媒で反応を行うことができれば反応は促進する。この点、「4-ハイドロキシフェニルジメチルスルフォニウムメチルサルフェイド」は溶媒として水を30%以内で用いることができるのである。また、本発明では、特にDCCと組み合わせて使用するとテアニンの収率を顕著に高めることができることを見出し、

る。「pH調整試薬」としては、特にジメチルアミノピリジン (DMAP) が好ましい。DMAPは、pH調整試薬としてだけではなく、活性化剤としても働き反応を促進する。

【0012】本発明において「Boc-Glu(NHC₂H₅)-OtBu」の酸処理は、トリフルオロ酢酸 (TFA)、塩化水素ガスを酢酸若しくはジオキサン中に吹き込んだ溶液、又は塩酸水溶液で処理すればよい。このような酸処理によって α 位のアミノ基及びカルボキシル基のOtBu基を一度に脱離させることができる。特に、反応性及び反応時間の点からすればTFAや酢酸中に塩化水素ガスを吹き込んだ溶液すなわちHCl in HCOOHで処理するのが好ましく、更に環境の点を加味すると、特にHCl in HCOOHが好ましい。しかも、塩酸濃度を1N~1.2Nに調整し、かつグルタミン酸誘導体の30等量分を用いて20分間反応させるのが好ましい。

【0013】上記製法により得られたテアニンは、有機溶媒 (エタノール) 中での再結晶、イオン交換樹脂、ゲル濾過、クロマトグラフィーによる吸着などによって精製することができテアニンの純度を一層高めることができる。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施例を説明して本発明を詳述する。

【0015】(実施例1)

〔出発原料の調製〕グルタミン酸をジオキサンに懸濁し、濃硫酸を加えてドライアイス-アセトンで冷却し、次いで同量のイソブチレンを加えて耐圧ビンに入れて一夜室温で放置した。放置後、冷却した2MのNaOH中に注ぎ、エーテルで抽出し、エーテル層を乾燥し減圧濃縮してH-Glu-OtBuを得た。次に、得られたH-Glu-OtBuをジオキサン-水 (2:1) に溶かして氷冷下かき混ぜながら、1M-NaOHと(Boc)₂O (ジ- t -ブチルカルボナート) とを加えて室温で30分かき混ぜ、その後減圧濃縮し、5%硫酸水素カリウム水溶液でpH2.3にして酢酸エチルで3回抽出した。全ての酢酸エチル層を水洗し、無水硫酸ナトリウムで一夜乾燥させた後減圧濃縮し、残ったオイル状のものを結晶化し、ターシャルブチルオキシカルボニルグルタミン酸ターシャルブチルエステル (Boc-Glu-OtBu) を得た。

【0016】〔Boc-Glu(NHC₂H₅)-OtBuの合成〕出発原料であるBoc-Glu-OtBu 5.72gをエチルアルコール100mlに溶解し、氷冷下に冷却し、攪拌しつつ4-ハイドロキシフェニルジメチルスルフォニウムメチルサルフェイト (商品名: サンセラ- DSP、以下DSPという) 5.86gとジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 4.53gとを加えて尿素誘導体を析出させて、エチルアミン塩酸塩

1. 79gとジメチルアミノピリジン (DMAP) との混液を加えて2日間攪拌した。薄層クロマトグラフィー (TLC) で反応追跡して反応終了を確認した後、尿素誘導体 (DCUrea) を用いて、母液を減圧濃縮し、オイル状の残渣を酢酸エチルに溶かし、この溶液を水で洗浄し、酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて一夜乾燥させた。その後硫酸ナトリウムを濾別し、母液を減圧濃縮し、更に氷冷下で石油エーテルを加えて結晶化させ、ターシャルブチルオキシカルボニルグルタミン酸ターシャルブチルエステル (Boc-Glu (NHCH₂H₅)-OtBu) の結晶を得た (収率: 70重量%、R_{f1}: 0.36、R_{f2}: 0.94、融点: 75~76℃、比旋光度: $[\alpha]_D^{25}$: -25 (C=1、メタノール))。なお、R_{f1} は薄層クロマトグラフィにより、展開溶媒としてクロロホルム: メタノール: 水=95:5:1 (v/v) を用いて行い、R_{f2} は展開溶媒としてブタノール: 酢酸: ピリジン: 水=4:1:1:2 (v/v) を用いて行った。

【0017】〔保護基の除去とL-テアニンの精製〕上記で得た「Boc-Glu (NHCH₂H₅)-OtBu」0.31gとアニソール30mlとを氷冷下に冷却し、トリフルオロ酢酸240mlを加えて時々振り混ぜながら30分間室温で放置した。その後濃縮して過剰のトリフルオロ酢酸を除去し、次いで未反応物を酢酸エチルで抽出除去し、水層を強陽イオン交換樹脂 (アンバーライトIR-124) に通して1Nアンモニア水100mlで溶出し、溶出液を濃縮し、これをエタノールで結晶化した (収率: 87重量%、R_{f1}: 0.00、R_{f2}: 0.52、融点: 218~219℃、比旋光度: $[\alpha]_D^{25}$: +13 (C=1、水))。この結晶の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びFABmassの測定結果を、図1及び図2に示した。この結果、得られた結晶は非常に高純度のL-テアニンであると判明した。

【0018】(実施例2)

〔保護基の除去とL-テアニンの精製〕実施例1において得られた「Boc-Glu (NHCH₂H₅)-OtBu」0.31gを、塩化水素ガスをギ酸中に吹き込んだ溶液 (1.27N HCl in HCOOH) 120mlに加え、時々振り混ぜながら30分間室温で放置した。その後濃縮して過剰の塩化水素を除去し、次いで冷却したエーテルを加えながらエーテルで結晶化させ、さらにエタノールで再結晶させた (収率: 88重量%、R_{f1}: 0.00、R_{f2}: 0.54、融点: 218~219℃、比旋光度: $[\alpha]_D^{25}$: +13 (C=1、水))。この結晶の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びFABmassの測定結果を、図3及び図4に示した。これより、得られた結晶は非常に高純度のL-テアニンであると判明した。

【0019】(実施例3)

〔保護基の除去とL-テアニンの精製〕実施例1において得られた「Boc-Glu (NHCH₂H₅)-OtBu」0.31gとアニソール30mlとを氷冷下に冷却し、トリフルオロ酢酸240mlを加えて時々振り混ぜながら30分間室温で放置した。その後冷却したエーテルを加えながら濃縮して過剰のトリフルオロ酢酸を除去し、次いで冷却したエーテルを加えながらエーテルで結晶化させ、さらにエタノールで再結晶させた (収率: 87重量%、R_{f1}: 0.00、R_{f2}: 0.52、融点: 218~219℃、比旋光度: $[\alpha]_D^{25}$: +13 (C=1、水))。この結晶の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びFABmassの測定結果を、図5及び図6に示した。これより、得られた結晶は非常に高純度のL-テアニンであると判明した。

【0020】(比較例1) 実施例1のエチルアルコールに代えて、溶媒としてDMFを使用したところ、エチルアミン塩酸塩がなかなか溶けなかった。エチルアミン塩酸塩は水に良く溶けるため、水を少量添加した後縮合させようとしたが縮合は進まなかった。

(比較例2) 実施例1において、ジメチルアミノピリジン (DMAP) を添加せずに反応させた (エチルアルコール溶液: pH4) が、pHの問題でうまく反応が進行しなかった。

(比較例3) 実施例1において、DSPを添加せずに反応させたが、反応は進行しなかった。

(比較例4) グルタミンの銅塩を合成し、DCC及びDSPを用いてエチルアルコールを脱水縮合させようとしたが反応が進行しなかった。

【0021】

【発明の効果】本発明のテアニンの製造方法によれば、従来の化学合成法に比べて製造コストがより安くなる上、製造工程中に人体に有害な物質を使用しないため、得られたテアニンを食品添加物として安全に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られたテアニンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定結果を示した図である。

【図2】同じく実施例1で得られたテアニンのFABmassの測定結果を示した図である。

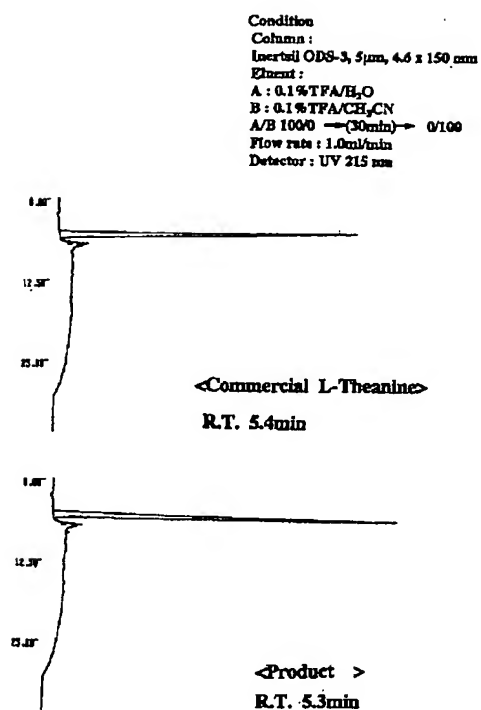
【図3】実施例2で得られたテアニンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定結果を示した図である。

【図4】同じく実施例2で得られたテアニンのFABmassの測定結果を示した図である。

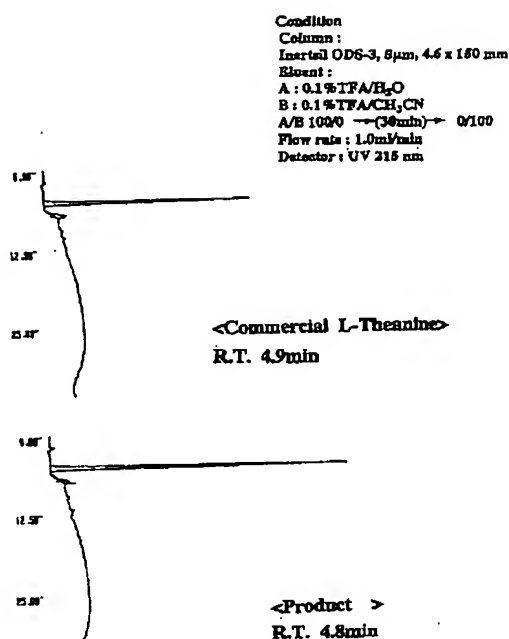
【図5】実施例3で得られたテアニンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定結果を示した図である。

【図6】同じく実施例3で得られたテアニンのFABmassの測定結果を示した図である。

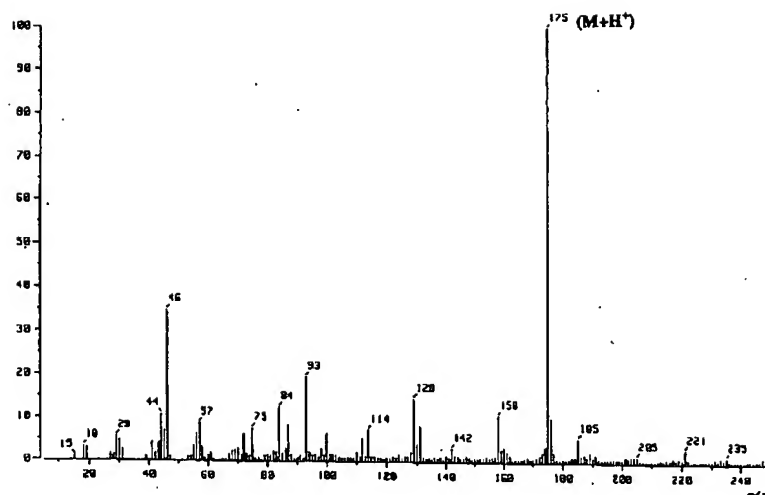
【図1】



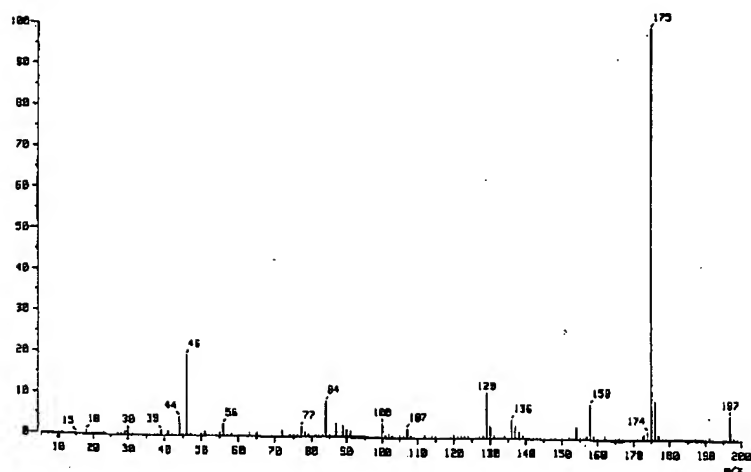
【図3】



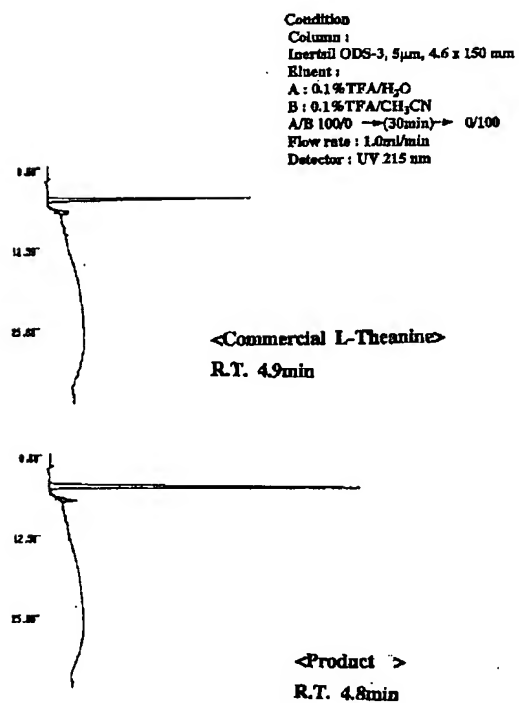
【図2】



【図4】

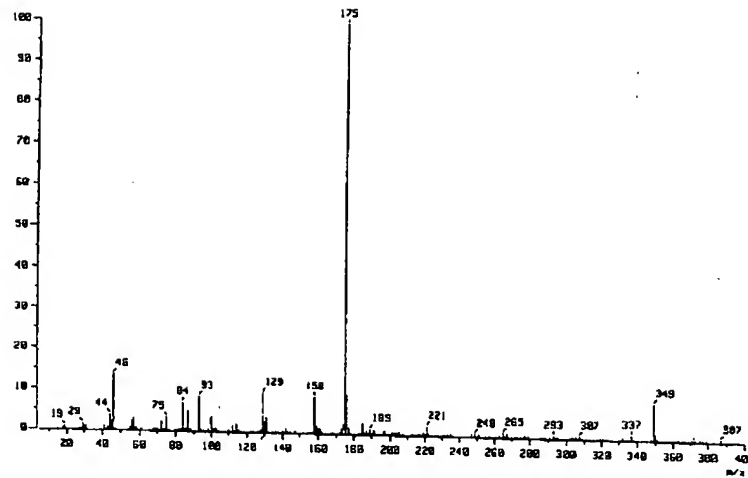


【図5】



(7) 開2000-26383 (P2000-263JL

【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 牛谷 公郎

静岡県榛原郡相良町女神21 株式会社伊藤
園内

Fターム(参考) 4H006 AA01 AC53 AC80 BD70 BS10
BU32 BV22